

THESIS

MARBURG

1968

Serologische Untersuchungen über Unterschiede
des H-Blutgruppenantigens
an epithelialen (Mundschleimhaut-) Zellen
von Sekretoren und Nichtsekretoren sowie auch
an O-Erythrozyten von Neugeborenen und Erwachsenen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Fritz Linnemann
aus Erfurt / Thüringen

Marburg 1968

**Serologische Untersuchungen über Unterschiede
des H-Blutgruppenantigens
an epithelialen (Mundschleimhaut-) Zellen
von Sekretoren und Nichtsekretoren sowie auch
an O-Erythrozyten von Neugeborenen und Erwachsenen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Fritz Linnemann
aus Erfurt / Thüringen

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 28.5.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. R. Sievert

Referent: Prof. Dr. M. Krüpe

Correferent: Prof. Dr. G.G. Wendt

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	5
Die biochemischen Beziehungen zwischen den ABO- und Lewis-Blutgruppensubstanzen.	
<u>Material und Methoden</u>	
I. Agglutinierende Testreagenzien	11
1. Anti-H-Phyttagglutinine	11
2. Anti-A-, -B- und -Le-Isoagglutinine	13
II. Gewinnung und Konservierung von:	
1. Wangenschleimhautzellen = Buccalzellen (BZ)	13
2. Erythrozyten	13
3. Blutplasma	14
III. Blutgruppenserologische Untersuchungstechniken	
1. Agglutinationsreaktionen	14
2. Agglutinationshemmungsreaktionen	15
IV. Mischzellagglutination	16
V. Transformationstechnik für Erythrozyten	17
<u>Ergebnisse</u> (10 Tabellen, 2 Abbildungen)	
1. Mischzellagglutination (BZ und O-Erys.), Versuche an BZ von Personen des Sekretor- und Nichtsekretortyps verschiedener Lewisgruppen	19
2. Charakterisierung der verschiedenen Anti-H-Reagenzien	27
3. Verhalten von Nabelschnurblutzellen gegenüber den verschiedenen Anti-H-Reagenzien	30

4. Transformationsversuche an Nabelschnurblut-Erythro- zyten mit ABH-(Le-) Mukoide enthaltendem Blut- plasma von Erwachsenen	33
<u>Besprechung</u>	36
<u>Zusammenfassung</u>	41
<u>Literaturverzeichnis</u>	44

Einleitung

Die biochemischen Beziehungen zwischen den ABO- und Lewis- Blutgruppensubstanzen.

Bei den ABO-Blutgruppenmerkmalen ist die O-Eigenschaft ursprünglich dadurch gekennzeichnet, daß sie weder mit Anti-A noch mit Anti-B reagiert.

Andererseits gibt es Reagenzien, die besonders stark O-Blutzellen agglutinieren, aber auch A- und B- und sogar noch AB-Blutzellen miterfassen. Demnach kann es sich bei dem mit ihnen nachweisbaren Antigenrezeptor nicht eigentlich um ein "O-Antigen" handeln, was mit der geltenden Formalgenetik unvereinbar wäre. Diesen den ABO-Blutgruppensubstanzen inhaerenten Rezeptor bezeichnet man als "H". Die biochemische Analyse der ABH-Antigene hat nun auch noch gezeigt, daß die Lewis-Eigenschaften mit ihnen eng verschränkt sind (24).

ABHLe-Blutgruppensubstanzen kommen sowohl an Zellen des Blutes, der Epithelien u.a. (2,4,5,21,22) als auch zellfrei in epithelialen Sekreten vor. Es sind komplexe Makromoleküle, die entweder als wasserlösliche Mukoide (Glykopeptide) in Sekreten wie Speichel, Magensaft, Ovarialzysteninhalt usw. oder teilweise auch als alkohol-lösliche Glykolipoide zellgebunden in Erscheinung treten. Der Kohlenhydratanteil trägt an beiden Formen die Antigen-determinanten.

Für die folgende Überlegung ist die Tatsache von Bedeutung, daß in alkoholischen Extrakten aus Erythrozytenstroma bisher nur A- und B-Glykolipoide (7), dagegen weder Le- noch H-aktive Glykolipoide aufgefunden wurden, obwohl die intakten Erythrozyten mit Anti-Le und Anti-H reagieren. Daraus kann man folgern, daß die Ausstattung der Erythrozytenoberfläche mit ABHLe-Antigenen heterogener Natur ist und sich nicht nur auf eine Stoffklasse beschränkt.

Bezüglich der Lewis-Antigene Le(a) und Le(b) scheint erwiesen zu sein, daß sie nur an den Mukoiden vorkommen, nicht an den Glykolipoiden. Sie werden an die Erythrozyten erst sekundär angelagert (15, 20); man kann sie nämlich "abwaschen" und auch "aufladen".

Ob eine sekundäre Anlagerung antigenhaltiger Mukoide auch für die H-Antigene gilt, wird einerseits durch die enge biochemische

Verwandtschaft zwischen Le- und H-Substanz (s.unt.) nahegelegt, andererseits aber auch durch die Tatsache in Frage gestellt, daß auch jene Individuen, in deren Sekreten keine mukoiden H-Substanz nachweisbar ist, die sog. "Nichtausscheider", H-spezifisch reagierende Erythrozyten besitzen und daß diese H-Spezifität in problematischer Weise mit der serologischen Eigenschaft "O" interferiert.

Die biochemische Analyse der ABHLe-Blutgruppenmukotide (Mol.gew. 300000-1 Mill.), die am weitesten vorangetrieben ist (16,23,24), läßt folgende Strukturen erkennen, die bezüglich des Kohlenhydratanteils vermutlich auch für die Glykolipide gilt:

An ein Grundgerüst, bestehend aus 15 Aminosäuren, sind kurze, 4 Zucker enthaltende Oligosaccharidketten gebunden. Wie Abbildung 1 veranschaulicht, wird die Biosynthese der Tetrasaccharid-Grundstruktur durch verschiedene unbekannte Gene gesteuert. Lediglich an dem endständigen Disaccharid, das β -glykosidisch (1-3 oder 1-4) nichtreduzierende D-Galaktose mit dem nachfolgenden N-Acetyl-D-Glukosamin verknüpft, sind zusätzlich maximal 3 Monosaccharide gebunden, die im wesentlichen die Antigen-spezifität des ABH Le-Systems determinieren und modifizieren, nämlich:

L-Fukose für Le(a), Le(b) und H,

D-Galaktose für B,

N-Acetyl-D-Galaktosamin für A,

und zwar nur α -glykosidisch. Le- und H-Gene steuern über spezifische Transferasen die Anheftung der L-Fukose an C₂ der D-Galaktose bzw. an C₄ des N-Acetyl-D-Glukosamins. Dadurch werden schließlich je nach dem entstandenen Struktur-bild die serologisch erfaßbaren Determinanten Le(a), Le(b) und H ausgebildet. B- oder A-Spezifität kann nur an präformiertem "H" durch 1-3 α -glykosidische Anheftung von D-Galaktose oder von N-Acetyl-D-Galaktosamin realisiert werden.

Für unsere Fragestellung ist wichtig, daß L-Fukose einen wesentlichen Bestandteil sowohl der H- als auch der Lewis-Antigenstrukturen darstellt; ein L-Fukosemolekül allein bestimmt je nach seinem Anheftungsort entweder H oder Le(a), während Le(b) durch 2 L-Fukosemoleküle, die also stets H und Le(a) beinhalten, charakterisiert wird (vergl. Abb.1).

Als "Sekretor" (Se) wird eine Person bezeichnet, in deren epithelialen Sekreten ABH-Mukotide nachgewiesen werden; als "Nichtsekretor" (se) dementsprechend eine solche, bei der sie in den Sekreten nicht nachgewiesen werden. Diese Unter-

scheidung berücksichtigt nicht das Vorhandensein von Lewis-determinierten Mukoiden in den Sekreten. Für die Feststellung des sog. Sekretorstatus kann man sich allein auf die Nachweisbarkeit von H beschränken; denn ohne H-Präformation gibt es keine A- oder B-determinierten Mukoide trotz Vorhandenseins der entsprechenden A- oder B-Gene. Die Ausprägung von A- oder B-Determinanten an den zellständigen Glykolipoiden ist von einer vorangehenden H-Synthese unabhängig.

Aus diesen Darlegungen geht hervor, daß eine Person, die nur ein Le(a)-spezifisches Mukoid besitzt (Genotyp = Le/Le), keine ABH-Mukoide haben kann, eine Person, die ein Le(b)-spezifisches Mukoid bildet (Genotyp = Le/H), auch ABH-Mukoide aufweist; d.h., Le(a+ b)-Personen sind stets "Nichtsekretoren", Le(a- b)-Personen stets "Sekretoren". Le(a- b)-Personen können entweder "Sekretoren" (Genotyp = H/H) oder "Nichtsekretoren" sein, je nachdem ob sie eine H-L-Fukose besitzen oder nicht. Nach der Hypothese von M. KRÜPE (10, neuerdings modifiziert) ist eine Le(a- b)-Person dann "Nichtsekretor", wenn sie reinerbig Le/Le ist, wie auch die Le(a+ b)-Personen, von denen sie sich dadurch unterscheidet, daß sie nur endständige 1-4- β -glykosidisch verknüpfte Disaccharide hat und daher für die Anheftung eines L-Fukose-Moleküls an C₄ des N-Acetyl-D-Glukosamins blockiert ist (vergl. Abb.1). Das Vorkommen von nur "1-4 Disacchariden" bei solchen Personen ist bisher noch nicht experimentell bewiesen worden.

Die dargestellte Hypothese kann auf die formalgenetisch postulierte Existenz der sog. "Sekretorgene (Se,se)" verzichten. Allerdings kann auch sie nicht die an Erythrozyten und Epithelzellen von Nichtausscheidern anzutreffende H-spezifische Reaktionsfähigkeit erklären (2,5).

Daß es qualitative Unterschiede innerhalb der H-Eigenschaft gibt, wird durch einige Beobachtungen gestützt (2,8,17). Auch die vorliegende Untersuchung will Argumente dafür liefern.

Während gewisse Beobachtungen dafür sprechen, daß ABH-Transformationen an Erythrozyten in vivo vorkommen (18), ist dies im Laborexperiment im Gegensatz zu den Erfolgen mit Le-Mukoiden

Biosyntheseweg der A, B, H, Le-Blutgruppenantigene an sezernierten Mukoiden.

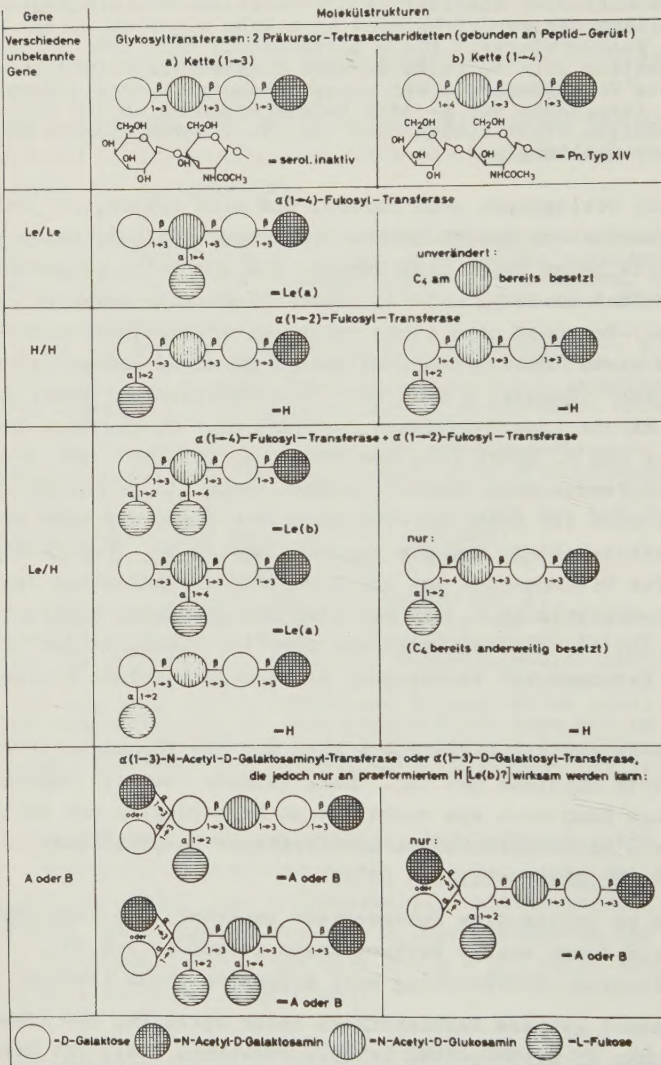


Abbildung 1

Schema von M. KRÜPE (unveröffentlicht) in Anlehnung an W.M. WATKINS; Science 152, 172-181 (1966)

bisher immer mißlungen. Dagegen ist eine Anlagerung von A- und B-Substanz an andere Körperzellen, z.B. Nieren- und Amnionzellen aus Gewebskulturen (6), Thrombozyten (12) sowie von H- und A-Mukoiden insbesondere an Buccalzellen (2,21) geglückt, wobei der Sekretorstatus von Bedeutung war.

Für die Erhellung der komplexen Struktur, welche dem serologisch erfaßbaren Phänomen "H" zugrunde liegt, war die Arbeit von L.L. FLORY (2) über Unterschiede im H-Antigen menschlicher Buccalzellen (BZ) in Abhängigkeit vom Sekretorstatus bedeutsam. L.L. FLORY entdeckte mit Hilfe der Mischzellagglutinationsmethode (MZA) zwei verschiedene H-Rezeptoren an menschlichen BZ, und zwar einen, der allen BZ gemeinsam war, und einen zweiten, der nur an Zellen von Sekretoren auftrat. Als Detektoren benutzte sie Anti-H-Agglutinine aus den Samen von *Ulex europaeus* und *Cytisus sessilifolius*.

Durch abgestufte Fraktionierung des *Ulex europaeus*-Extraktes mit Aethanol konnte sie zwei unterschiedliche Anti-H-Agglutinine gewinnen. Jenes, welches mit sämtlichen BZ reagierte, fand sich sowohl im Rohextrakt von *Ulex europaeus* als auch in seinen 30%- und 50%-igen Aethanolfraktionen dasjenige aber, welches allein die BZ von Sekretoren zu einer MZA mit O-Erythrozyten veranlaßte, war nur in der 70%-igen *Ulex*-Aethanolfraktion enthalten.

Wurden die BZ der Nichtsekretoren im Speichel von Sekretoren inkubiert, verhielten sie sich bei der anschließend durchgeführten MZA wie Sekretorzellen, d.h., sie reagierten nun auch mit der 70%-igen *Ulex*-Aethanolfraktion.

In Agglutinationshemmversuchen mit verschiedenen Zuckern zeigte L.L. FLORY, daß die 70%-ige *Ulex*-Aethanolfraktion durch L-Fukose, die 30%- und die 50%-igen Fraktionen jedoch nicht durch L-Fukose, sondern vornehmlich durch Glukose enthaltende Saccharide, besonders gut durch Salicin und Laktose, gehemmt wurden. Der Extrakt aus *Cytisus sessilifolius* verhielt sich bezüglich der MZA von BZ und in seiner Hemmbarkeit durch Zucker ähnlich wie die 30%- und 50%-igen *Ulex*-Aethanolfraktionen.

In Anlehnung an biochemische Befunde von W.M. WATKINS und W.T.J. MORGAN 1962 (25) und von V.P. REGE et al. 1964 (17), wo-

nach sowohl α -glykosidisch gebundene L-Fukose, als auch β -glykosidisch gebundenes N-Acetyl-D-Glukosamin für die H-Spezifität an Blutgruppensubstanzen verantwortlich sind, worauf übrigens 1955 M. KRÜPE (8) erstmalig aufmerksam gemacht hatte, zog die Autorin aus ihren Experimenten den Schluß, daß "L-Fukose-determiniertes H" nur an BZ von Sekretoren vorhanden, "N-Acetyl-D-Glukosamin-determiniertes H" jedoch den BZ aller Individuen - Sekretoren und Nichtsekretoren - gemeinsam sei.

Aufgabenstellung

Durch diese Resultate angeregt, haben wir uns die Aufgabe gestellt, herauszufinden, ob sich Unterschiede in der H-Spezifität, wie L.L. FLORY sie an BZ aufgezeigt hatte, auch an Erythrozyten mit Hilfe der Ulex-Fraktionen nachweisen ließen. Die Untersuchungen haben wir auf weitere Anti-H-Agglutinine ausgedehnt. Hierfür boten sich vorwiegend Laburnum alpinum und Lotus tetragonolobus an.

Wenn verschiedene Anti-H-Agglutinine tatsächlich in ihrer Spezifität auf unterschiedliche Molekülbezirke der H-Oligosaccharidkette eingestellt sind, dann müßten mukoidarme frühkindliche O-Erythrozyten in charakteristischer Weise anders mit ihnen reagieren als Erythrozyten von Erwachsenen.

Endlich wurden auf Grund dieser Überlegung Transformationsversuche mit ABH-Mukoiden in vitro an Nabelschnurblutzellen anstelle von Erwachsenenblutzellen durchgeführt.

Anlaß zu derartigen Studien ist das genetisch und biochemisch immer noch ungeklärte "O/H-Problem" der Blutgruppenmerkmale.

Material und Methoden

Zur Durchführung meiner Untersuchungen benötigte ich Reagenzien für den Nachweis der "H"-Eigenschaft sowohl an Zellen als auch in Lösungen, ferner Blutzellen von Erwachsenen und Neugeborenen, Blutplasma und Buccalzellen von Personen bekannter ABO-, Le-Blutgruppenzugehörigkeit.

Als besondere Untersuchungsmethode benutzte ich die Mischzellagglutination in der Weise, wie sie von L.M. SWINBURNE, B.B. FRANK und R.R.A. COOMBS (21) angegeben worden ist.

I. A g g l u t i n i e r e n d e T e s t r e a g e n z i e n .

1. Anti-H-Reagenzien(=Phytagglutinine).

Als Rohstoffe für die Herstellung H-spezifischer Phytagglutininlösungen wurden die Samen von *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus*, *Laburnum alpinum*, die getrockneten Wurzeln aus *Ononis spinosa* und die Samenmäntel von *Evonymus europaea* verwendet. Bis auf *Ulex europaeus*-Samen, der von der Fa. Eichenberg & Co., Miltenberg a.M. bezogen wurde, stammten sämtliche Substanzen aus dem Staatl. Medizinaluntersuchungsamt in Fulda.

a) Rohextrakte:

Die Extrakte wurden in der üblichen Weise durch Aufschwemmung der pulverisierten Pflanzenteile in 0,9%-iger gepufferter (pH=7,2) NaCl-Lsg. im Verhältnis 1 g auf 5 ml hergestellt. Von *Laburnum alpinum* wurden lediglich die agglutininhaltigen radicle zur Extraktbereitung benutzt, von *Evonymus europaea* die zerriebenen Samenmäntel. Nach 1-stündiger Inkubation der Aufschwemmung bei +37°C, darauffolgender 18-stündiger bei +4°C, anschließendem Zentrifugieren und Dekantieren wurden klare Pflanzenextrakte gewonnen, die schließlich noch durch 24-48 std. Dialyse

gegen das Lösungsmedium auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und gebrauchsfertig in kleinen Portionen bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt wurden.

- b) Agglutininpräparate aus *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus* und *Laburnum alpinum*, gewonnen durch fraktionierte Ausfällung der Rohextrakte mittels Aethanol in der Kälte bei 30%, 50% und 70% Sättigung nach L.L. FLORY (2).

Die Rohextrakte wurden zunächst zu 10 (v/v)% mit 96%-igem Aethanol versetzt und 18 Std. bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Das in dieser Zeit entstandene Präzipitat wurde durch Zentrifugieren (20 min b. 3000 U/min) sedimentiert und verworfen. Es war praktisch agglutininfrei. Zum klaren, vom Bodensatz dekantierten Überstand wurde weiteres 96%-iges Aethanol zugefügt bis zu einer 30 (v/v)%-igen Konzentration; nach erneuter 18-std. Inkubation bei $+4^{\circ}\text{C}$ erhielt ich das 30%-ige Aethanolpräzipitat. In gleicher Weise wurden durch ansteigende Aethanolkonzentrationen in den erhaltenen Überständen die 50%-igen und 70%-igen Aethanolpräzipitate gewonnen.

Diese drei Fraktionen (30%, 50%, 70%) waren agglutininhaltig; sie wurden in 0,9%-iger gepuff. (pH=7,2) NaCl-Lsg. aufgelöst und alsdann zur Entfernung der ihnen noch anhaftenden Aethanolreste 24 Std. bei $+4^{\circ}\text{C}$ gegen das Lösungsmittel dialysiert, anschließend in kleine Portionen abgeteilt und bis zur Benutzung bei -20°C in der Tiefkühltruhe gehalten.

Anmerkung: Um aus den Präzipitaten möglichst stark wirkende Agglutininlösungen zu erhalten, habe ich für die Auflösung der Präzipitate möglichst wenig gepufferte NaCl-Lsg. verwendet. Die erhaltene Lösung war deutlich getrübt. Nach Zentrifugieren setzte sich vom klar gewordenen Überstand ein Sediment ab, das nur wenig Agglutinine enthielt. Die im Verlauf der Aufbewahrung der klaren Überstände immer noch auftretenden Ausflockungen, die z.T. recht voluminös waren, erwiesen sich bei Wiederauflösung als praktisch agglutininfrei. Das Agglutinin stellt demnach nur einen kleinen, relativ leicht löslichen Anteil der durch Fraktionierung isolierten Proteingemische dar.

2. Anti-A-, -B- u. Le-Isoagglutinine.

Zur Bestimmung der ABO-Blutgruppen wurden käufliche Testseren, z.T. immuner Natur, zur Lewis-Gruppenbestimmung Anti-Le(a)- und Anti-Le(b)-Seren der Fa. Dade Reagents Inc. Miami, Florida benutzt.

II. Buccalzellen (BZ), Erythrozyten und Blutplasma. Gewinnung und Konservierung.

1. BZ.

4 Personen der Blutgruppe O und 4 Personen der Blutgruppe A₁, die jeweil die 4 möglichen Kombinationen der Sekretoreigenschaften mit den 3 Lewistypen repräsentierten, nämlich

Le(a- b+), Se

Le(a+ b-), se

Le(a- b-), Se

Le(a- b-), se,

wurden zur Entnahme von BZ ausgewählt (s. III., Abs.1). Nach Ausspülen des Mundes mit destilliertem Wasser wurde die Wangenschleimhaut mit einem Kunststoffspatel beschabt, der anschließend in ca. 50 ml einer Speziallösung (n. L.M. SWINBURNE, modifiziert durch L.L. FLORY: Phosphatgepufferte (pH=7,2) 0,9%-ige NaCl.-Lsg. mit 0,02% Rinderalbumin) abgespült wurde. Dieser Vorgang wurde 10-15 mal wiederholt. Die auf solche Weise hergestellte BZ-Suspension blieb zur Sedimentation großer Zellkonglomerate 10 min lang unberührt und wurde dann unter Zurücklassung des Sediments in Zentrifugengläser umgegossen und 3 mal in der Speziallösung gewaschen. Die BZ wurden schließlich in ca. 10 ml der 20% Glycerin enthaltenden Speziallösung suspendiert und bis zur Benutzung bei -20°C aufbewahrt.

2. Erythrozyten.

Für die Mischzellagglutination wurden O, Le(a- b+)-Erys. aus A.C.D.-stabilisiertem Venenblut Erwachsener nach 3-maliger

Waschung unmittelbar vor Versuchsbeginn als 0,5%-ige Suspension in Speziallösung bereitgestellt.

Die Nabelschnurblute stammten aus der Geburtshilflichen Abteilung des Städt. Krankenhauses in Fulda. Sie wurden unmittelbar nach der Abnabelung aus dem plazentaren Teil der Nabelschnur in Röhrchen oder, soweit sie für die Transformationsversuche verwendet werden sollten, in sterilen Erlenmeyer-Kölbchen (25 ml), die einige Tropfen Heparin enthielten, aufgefangen.

3. Blutplasma.

Aus je 500 ml frischem, A.C.D.-stabilisiertem Konservenblut der Gruppe O, Le(a- b+) und A₁B, Le(a- b+) wurde unter Wahrung der Sterilität durch Zentrifugieren (30 min b. 4000U/min) jeweils 200 ml Plasma gewonnen, welches nach Zusatz von 2 mg Streptomycin und 2000 E Penicillin pro ml bei -20°C tiefgefroren gehalten wurde.

III. Blutgruppenserologische Untersuchungen.

109 Personen spendeten im Rahmen einer im Humangenetischen Institut der Universität Marburg durchgeführten Untersuchung ca. 1 ml Speichel und etwa 5 ml Blut. Die Speichelproben wurden innerhalb der 1. Std. nach ihrer Gewinnung 10 min lang gekocht und dann bei -15°C eingefroren. Nach Bestimmung ihrer ABO- und Le-Gruppenzugehörigkeit und ihrer Sekretorstaten stellten diese Personen ein geeignetes Spenderreservoir auch für meine Untersuchungen dar.

1. Agglutinationsreaktionen zur Bestimmung der ABO- und Lewis-Blutgruppen.

Die ABO-Gruppenzugehörigkeit der Spender wurde mit Hilfe der Röhrchenmethode ermittelt, die Bestimmung ihrer Lewis-Gruppe erfolgte auf der Tüpfelplatte unter Verwendung von Anti-Le-Seren, 10%-iger Rinderalbumin- und Löw'scher Papain-

lösung (Methode: Med. Untersuchungsamt Fulda).

2. Agglutinationshemmungsreaktionen.

a) zur Bestimmung des Sekretorstatus.

Die Sekretorstaten der Spender wurden an Hand der aufgetauten Speichelproben in der üblichen Weise in Röhrchen mit Hilfe der Hämagglutinations-Hemmtechnik bestimmt. Hierbei wurde je 1 Tropfen eines auf 4 Agglutinationsdosen verdünnten Ulex europaeus-Extraktes mit je 1 Tropfen der 1:4 mit 0,9%-iger NaCl-Lsg. verdünnten Speichelproben 1/2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor je 1 Tropfen einer 2%-igen Suspension von O-Erythrozyten zugesetzt wurde. Ablesung auf Agglutination nach weiteren 15 min und kurzer Zentrifugation. Röhrchen, in denen keine Agglutination sichtbar war, enthielten Speichelproben, die mit dem Anti-H in Reaktion getreten waren, so daß dieses nicht mehr für die Agglutination der O-Erys. verfügbar war, d.h., die Agglutination der Erys. war durch die Speichelprobe des "H"-Ausscheiders gehemmt worden. Röhrchen mit Agglutination enthielten Speichelproben von "H"-Nichtausscheidern.

b) zur Bestimmung gelöster Blutgruppensubstanz im Blutplasma.

Das Vorkommen von A-Substanz im Plasma eines Menschen der Blutgruppe A₁B, Le(a- b+) wurde durch Zugabe des unverd. Plasmas zu einer geom. Verdünnungsreihe von Anti-A-Serum in etwa quantitativ geprüft. Nach einer Bindungszeit von 1 Std. wurden Erys. der Gruppe A₁ als Indikatorzellen zugefügt. Der Titerrückgang der Erythrozytenagglutination im Vergleich zu Kontrollreihen erlaubt einen Rückschluß auf die Anwesenheit neutralisierender A-Substanz im Plasma.

c) zur Bestimmung der Hemmaktivität von Zuckern.

Die Agglutinationshemmwirkung von Zuckerlösungen wurde quantitativ unter Benutzung der auf 4 Agglutinationsdosen verdünnten Anti-H-Phyttagglutininlösungen bestimmt. Es wurden nur

folgende Zucker bzw. Glykoside überprüft: L-Fukose, Salicin, Laktose. Diese wurden in 0,9%-ig. NaCl-Lsg. mit 0,03%-ig. Zusatz einer 8%-ig. Rinderalbuminlsg. gelöst: L-Fukose 1%-ig., Salicin und Laktose jedoch 10%-ig unter Angabe der molaren Konzentrationen. In einer Röhrchenreihe wurden zu je 1 Tropfen der geom. verd. Zuckerlsg. je 1 Tropfen der verd. Phyttaggl.-Lsg. gegeben. Nach 1-std. Bindungszeit bei Zimmertemperatur Zugabe der O-Indikatorzellen und weiter wie oben.

Der Grad der Hemmbarkeit war quantitativ an dem Ausbleiben der Agglutination in der Röhrchenreihe direkt ablesbar.

IV. M i s c h z e l l a g g l u t i n a t i o n (MZA) v o n B u c c a l z e l l e n (BZ) u n d O - E r y t h r o - z y t e n . Technik nach L.M. SWINBURNE (21).

Sämtliche für die MZA benutzten Glasgeräte wurden unter Verwendung des Präparates Siliclad der Fa. Clay-Adams, Inc., New York silikonisiert.

Die der Kühltruhe entnommenen BZ wurden 3 mal gewaschen und dann in der Weise in der Speziallösung suspendiert, daß bei mikroskopischer Betrachtung unter 100-facher Vergrößerung ca. 20 Zellen im Gesichtsfeld erschienen. Die Pflanzenextrakte bzw. die Lösungen ihrer Aethanolfraktionen wurden in geom. Reihe verdünnt bis zum Wert 1:16. 2 Tropfen der BZ-Suspension wurden mit je 2 Tropfen der verschiedenen Verdünnungsstufen der Phyttagglutininlsg. in Röhrchen (6 mm x 8 cm) zusammengebracht und anschließend 1 Stunde lang bei Raumtemperatur auf einer Schüttelmaschine in ständiger Bewegung gehalten. Anschließend wurden die BZ durch Zentrifugieren (4 min b. 1500 U/min) sedimentiert, die überstehende Flüssigkeit mit Hilfe einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in der Speziallösung 3 mal gewaschen, um die nicht an die Zellen gebundenen Agglutinine vollständig zu entfernen und schließlich auf ca. 1 Tropfen eingeengt.

Zu diesem Tropfen der BZ-Suspension wurde 1 Tropfen einer 0,5%-igen Suspension 3 mal gewaschener O-Erythrozyten gegeben und diese Mischung sofort zentrifugiert (1 min bei 1000 U/min). Die Zentrifugeneinsätze samt den Röhrchen wurden darauf unter Vermeidung jeder Erschütterung in einen Behälter mit Eiswasser gestellt und zum Mikroskopiertisch transportiert. Mittels Pasteurpipetten wurden die Mischzellagglutinate aus jeweils 3 Röhrchen nebeneinander auf einen Objektträger aufgetropft, sofort mit Deckgläschen versehen und unter dem Mikroskop betrachtet. Die Agglutinationsstärke wurde nach folgender Skala bemessen, der das Verhältnis der mit Erythrozyten besetzten BZ zur Menge aller sichtbaren BZ als Eichmaß zugrunde gelegt worden war:

- 0 keine Agglutinate
- 1 nur vereinzelte Agglutinate
- 2 wenige, aber deutlich sichtbare Agglutinate
- 3 weniger als 50% aller BZ mit Erys. besetzt
- 4 50% und mehr mit Erys. besetzt
- 5 überwiegender Teil (ca.70%) aller BZ mit Erys. besetzt
- 6 fast vollständige Besetzung (über 90%) aller BZ

Anmerkung: Da auf photomikroskop. Aufnahmen der MZA nur jeweils ein kleiner Ausschnitt der Präparate abgebildet werden konnte, eignen sie sich nicht zur Dokumentation der Versuchsergebnisse nach der aufgeführten Skala. Soweit sie im Text erscheinen haben sie illustrierenden Charakter.

V. Transformationstechnik nach J.S. SNEATH (20); O. u. P. MÄKELÄ (13)

Heparinisiertes Nabelschnurblut der Gruppe O (s. II, 2) wurde durch Zentrifugieren (20min bei 3000 U/min) unter sterilen Bedingungen vom Plasma befreit. Je 2 ml des Erythrozytensediments wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette in jeweils 18 ml des von Erwachsenen stammenden Plasmas (s. II, 3) der Gruppe O, Le(a- b+) und der Gruppe A₁B, Le(a- b+) in Erlenmeyerkölbchen (50 ml) inkubiert. Die Kölbchen wurden mit abgeflamten Gummistopfen dicht verschlossen und im Brutraum bei +37°C auf einer Schüttel-

maschine in ständiger Bewegung gehalten. Nach 24 Std. wurde eine Probe der inkubierten Erythrozyten nach 1-maliger Waschung gegen Anti-A-, -B- und -AB-Immunseren, gegen Anti-Le-Seren und gegen Anti-H-Agglutinine aus *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus* und *Laburnum alpinum* getestet. Das restliche Inkubat wurde in sterile Zentrifugenröhrchen umgegossen und verschlossen zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde darauf mittels einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch die gleiche Menge frischen Plasmas ersetzt. Alsdann wurde die Inkubation in Erlenmeyerkölbchen auf der Schüttelmaschine bei $+37^{\circ}\text{C}$ fortgesetzt. Testung der inkubierten Erythrozyten und Plasmaaustausch wurden alle 24 Std. wiederholt, bis eine Hämolyse der Erythrozyten - gewöhnlich am 5. Tag der Inkubation - eintrat.

Einmal wurde das Experiment in der Weise modifiziert, daß vor der Inkubation dem Plasma des O-Spenders im Verhältnis 10:1 Speichel eines starken "H"-Ausscheiders, dem des A₁B-Spenders im gleichen Verhältnis käufliche A-Substanz (Fa. Biotest, Frankf. M) zugesetzt wurde.

Ergebnisse

Die Agglutinationstiter der verschiedenen Anti-H-Reagenzien gegen O-Erythrozyten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Daraus ist zu ersehen, daß die 50%- und 70%-ige Ulex-Aethanolfraktion die Testblutzellen stärker agglutinierte als der Ulex-Rohextrakt. Das gilt in geringerem Maße auch für die 70%-ige Laburnum-Aethanolfraktion gegenüber dem Rohextrakt. Nicht in allen Fällen konnte eine Agglutininanreicherung durch die Aethanol-Fraktionierung erzielt werden (vergl. Lotus-Fraktionen, Ulex 30%, Laburnum 30% und 50%).

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die angegebenen Titerwerte nicht für alle O-Blutzellen gleich waren. Titerunterschiede von 3 Verdünnungsstufen konnten beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden als Indikator-O-Zellen stets solche des gleichen Spenders benutzt.

1. Mischzellagglutination (BZ und Erys.)

Abbildung 2 zeigt photomikroskopische Aufnahmen der MZA bei typisch positiven und typisch negativen Ausfällen. Es sind 3 Präparate teils unter verschiedenen Vergrößerungen wiedergegeben:

- a)-c) = Se-BZ bei Verwendung von Ulex-Extrakt
- d) u. e) = Se-BZ bei Verwendung von 70% Ulex-Aeth.-Frakt.
- f) = se-BZ bei Verwendung von 70% Ulex-Aeth.-Frakt. (neg. Kontrolle)

Bereits auf den Übersichtsaufnahmen a), d) erkennt man die Mischzellagglutinate aus BZ und Erys. als dunkle Bezirke. Der Erythrozytensaum selbst ist bei b), c) und e) deutlich auszumachen. Bei negativem Ausfall f) stellt sich dagegen ein gleichmäßig helles Bild dar, auf dem die zarten Umrisse der BZ keine Beziehung zu den regellos verstreuten Erys. erkennen lassen.

(Die Aufnahmen wurden mit dem Photomikroskop von Zeiss unter Verwendung der Belichtungsautomatik gemacht. Film: Adox, 24 x 36, 14 Din. Abbildungsmaßstäbe der Negative: a), d) : 32:1; b), e) und f): 80:1; c): 200:1.)

Tabelle 1

Titer der Anti-H-Phytagglutinine gegen O-Erythrozyten

	2 Tr. 2%-ige O-Erythr.-Susp.in 0,9%-iger NaCl-Lsg. + 2 Tr. der Agglutininverdünnungen 1/-:									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
Ulex europ. Extrakt	3	3	3	3	2	1				
Ulex-Aeth.- Fraktionen:										
30%	3	3	3	3	2	1				
50%	3	3	3	3	3	2	1			
70%	3	3	3	3	3	3	2	1		
Lotus tetragon.- Extrakt	3	3	3	3	2	1				
Lotus-Aeth.- Fraktionen:										
30%	2	1								
50%	3	3	2	1						
70%	3	3	3	2	2	(1)				
Laburn. alp.- Extrakt	3	3	2	1						
Laburn.-Aeth.- Fraktionen:										
30%	2	1								
50%	3	3	3	3	2	(1)				
Ononis spin.- Extrakt	3	3	3	2	1					
Evonymus europ.- Extrakt	3	3	3	3	2	1				

Röhrchentest, Ablesung nach 20 min bei Zi.T. und Zentrifug.
(1 min bei 1500 U/min).

Anmerkung: Alle Test-Erys. stammen von derselben Person der
Lewis-Gruppe Le(a- b+). Die Agglutinationsstärke ist durch
die Zahlen 1-3 ausgedrückt:

- 3= großes, zusammenhängendes Agglutinat, Suspensions-
flüssigkeit klar
- 2= zusammenhängendes Agglutinat, Suspensionsflüssigkeit
leicht rötlich (enthält freie Erys.)
- 1= Agglutinate in Suspensionsflüssigkeit, die viele
freie Erys. enthält
- (1)= kleine Agglutinate in der Erythr.-Suspension noch
gerade erkennbar
- keine Zahl = keine Agglutination

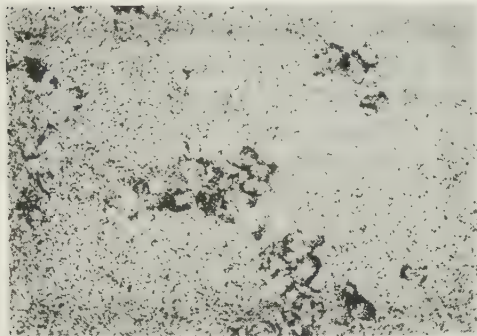
Abbildung 2

Photomikroskopische Aufnahmen
der Mischzellagglutination zwischen Buccalzellen und O-Erythrozyten (s. Text S.19)

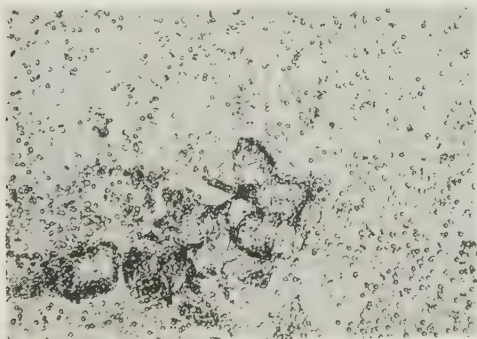
Ulex-Extrakt, 0-, Se-BZ

70% Ul-Frakt., 0-, Se-BZ

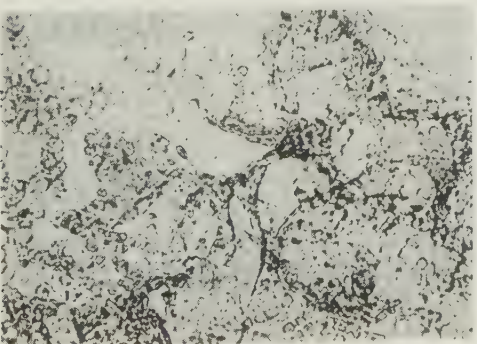
a) 32:1



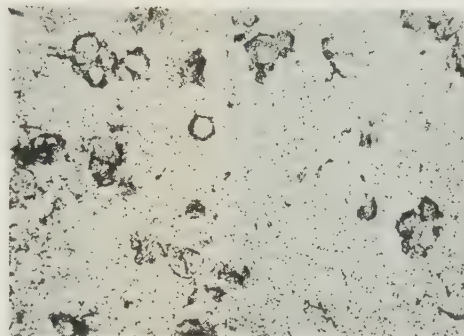
b) 80:1



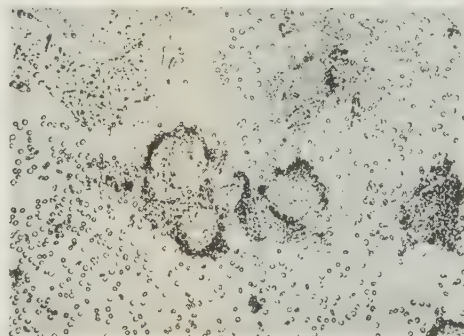
c) 200:1



d) 32:1

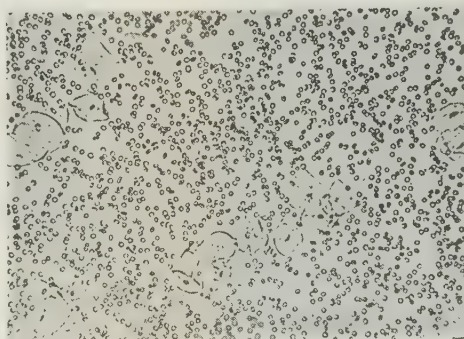


e) 80:1



70% Ul.-Frakt., 0-, se-BZ

f) 80:1
(=negative
Kontrolle)



Die Ergebnisse der MZA bei Verwendung der Ulex-Aethanolfraktionen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die benutzten BZ stammten von 2 Ausscheidern (Se) und 2 Nichtausscheidern (se) der Blutgruppe O, ferner von 1 Ausscheider und 3 Nichtausscheidern der Gruppe A₁.

Zunächst fällt auf, daß die 70%-ige Ulex-Fraktion stark mit Se-BZ, so gut wie niemals jedoch mit se-BZ reagiert. Die 30%- und 50%-ige Fraktion reagieren dagegen sowohl mit Se-BZ als auch mit se-BZ. Die 30%-ige tendiert sogar dahin, se-BZ zu bevorzugen. Das wird besonders deutlich, wenn man die Score-Werte in Tabelle 4 und 5 betrachtet.

Hinsichtlich des unterschiedlichen Verhaltens der 70%-igen Ulex-Fraktion gegenüber Se- und se-BZ kam ich zu dem gleichen Resultat wie L.L. FLORY (2). Das gilt im wesentlichen auch für die Ergebnisse bei Verwendung der 30%- und 50%-igen Fraktion, mit dem Unterschied, daß bei L.L. FLORY die 50%-ige dazu neigte, die se-BZ bei der MZA zu bevorzugen.

Tabelle 3 zeigt die MZA-Werte, die mit den Extrakten aus Lotus tetragonolobus, Laburnum alpinum und ihren 70%-igen Aethanolfraktionen erzielt wurden. (Die 30%- und 50%-igen Fraktionen von Lotus und Laburnum waren zu schwach, um noch eine MZA mit BZ zu bewirken. Deshalb wurden sie nicht benutzt.)

Extrakte und 70%-ige Aethanolfraktionen aus Lotus und Laburnum reagierten gut mit Se-BZ, nur noch schwach bzw. gar nicht mit se-BZ. Die Score-Werte in Tabelle 4 und 5 lassen folgende Abstufung ihrer Wirkungsstärke bei der MZA erkennen: Lotus-Extrakt > 70%-ige Laburnum-Fraktion > 70%-ige Lotus-Fraktion > Laburnum-Extrakt. Die gleiche Reihenfolge ergibt sich aus einem Vergleich ihrer Hämagglutinationstiter (s. Tabelle 1).

Bei den Ulex-Aethanolfraktionen dagegen läßt sich eine derartige Proportionalität zwischen ihrer Wirkungsstärke auf O-Erythrozyten und bei der MZA nicht feststellen. Hier agglutiniert z.B. die 70%-ige Fraktion bei einem Hämagglutinationstiter von 256 se-BZ nicht, die 30%-ige bei einem von 64 jedoch gut.

Tabelle 2

Mischzellagglutination zwischen Buccalzellen und O-Erythrozyten bei Verwendung der Ulex-Aethanol-Fractionen

Nr. der BZ-Spender	Buccalzellen	Verdünnungsgrad der Fraktionen	Ulex-Aethanol-Fractionen:		
			30%	50%	70%
1)	O, Se <u>Le(a- b+)</u>	1 : 2	4	4	6
		1 : 4	2	3	5
		1 : 8	1	3	4
		1 : 16	0	1	2
2)	O, se Le(a+ b-)	1 : 2	4	3	1
		1 : 4	2	2	0
		1 : 8	1	2	0
		1 : 16	0	1	0
3)	O, Se <u>Le(a- b-)</u>	1 : 2	3	1	6
		1 : 4	0	0	5
		1 : 8	0	0	4
		1 : 16	0	0	1
4)	O, se Le(a- b-)	1 : 2	5	3	0
		1 : 4	3	1	0
		1 : 8	1	0	0
		1 : 16	0	0	0
5)	A ₁ , Se <u>Le(a- b+)</u>	1 : 2	4	4	4
		1 : 4	2	3	4
		1 : 8	1	2	2
		1 : 16	0	0	1
6)	A ₁ , se Le(a+ b-)	1 : 2	5	5	0
		1 : 4	4	5	0
		1 : 8	1	3	0
		1 : 16	0	0	0
7)	A ₁ , se Le(a- b-)	1 : 2	5	3	0
		1 : 4	3	2	0
		1 : 8	2	0	0
		1 : 16	1	0	0
8)	A ₁ , se Le(a- b-)	1 : 2	3	2	0
		1 : 4	2	1	0
		1 : 8	0	0	0
		1 : 16	0	0	0

Anmerkung: Die Zahlen in den letzten 3 Spalten geben die Stärke der Mischzellagglutination an.
Eichmaßstab s. Text S.17

Tabelle 3

Mischzellagglutination zwischen Buccalzellen und O-Erythrozyten bei Verwendung der Extrakte aus Lotus tetragonolobus und Laburnum alpinum und den 70%-igen Aethanolfraktionen dieser Extrakte

Nr.d.BZ-Spender-	Buccal-zellen	Verdg.	Lotus tetragonolobus		Laburnum alpinum	
			Extrakt	70%ig. Fr.	Extrakt	70%ig. Fr.
1)	O, Se Le(a- b+)	1 : 2	5	4	4	5
		1 : 4	4	3	2	3
		1 : 8	2	2	1	1
		1 : 16	1	0	0	0
2)	O, se Le(a+ b-)	1 : 2	3	1	0	1
		1 : 4	2	0	0	0
		1 : 8	1	0	0	0
		1 : 16	0	0	0	0
3)	O, Se Le(a- b-)	1 : 2	5	4	4	5
		1 : 4	4	4	2	4
		1 : 8	3	2	0	2
		1 : 16	1	1	0	0
4)	O, se Le(a- b-)	1 : 2	0	0	0	0
		1 : 4	0	0	0	0
		1 : 8	0	0	0	0
		1 : 16	0	0	0	0
5)	A ₁ , Se Le(a- b+)	1 : 2	4	4	3	4
		1 : 4	2	2	1	2
		1 : 8	2	1	0	1
		1 : 16	0	0	0	0
6)	A ₁ , se Le(a+ b-)	1 : 2	2	0	0	1
		1 : 4	1	0	0	1
		1 : 8	0	0	0	0
		1 : 16	0	0	0	0
7)	A ₁ , se Le(a- b-)	1 : 2	2	1	0	1
		1 : 4	1	0	0	0
		1 : 8	0	0	0	0
		1 : 16	0	0	0	0

Tabelle 4

Arithmetische Mittel der Meßzahlen (Score-Werte) für die Mischzellagglutinationsstärke jeweils der 4 Agglutininverdünnungsstufen (aufgerundet).

Nr.d.BZ-Spender	BZ	Ulex-Aeth.-Frakt.			Lotus tetrag.		Laburn. alpin.	
		30%	50%	70%	Extr.	70% Fr.	Extr.	70% Fr.
1)	O, Se Le(a-b+)	1,8	2,8	4,3	3,0	2,3	1,8	2,3
2)	O, se Le(a+b-)	1,8	2,0	0,3	1,5	0,3	0,0	0,3
3)	O, Se Le(a-b-)	0,8	0,3	4,0	3,3	2,3	1,5	2,8
4)	O, se Le(a-b-)	2,3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5)	A ₁ , Se Le(a-b+)	1,8	2,3	2,8	2,0	1,8	1,0	1,8
6)	A ₁ , se Le(a+b-)	2,5	3,3	0,0	0,9	0,0	0,0	0,5
7)	A ₁ , se Le(a-b-)	2,8	1,3	0,0	0,8	0,3	0,0	0,3
8)	A ₁ , se Le(a-b-)	1,3	0,8	0,0				

Tabelle 5

Arithmetische Mittel der Meßzahlen für die Mischzellagglutinationsstärke jeweils aller Sekretor- und Nichtsekretor-Buccalzellen unter Einschuß sämtlicher Verdünnungsstufen (aufgerundet).

Sokr.-Typ d. BZ-Spender	Ulex-Aeth.-Frakt.			Lotus tetrag.		Laburn. alpin.	
	30%	50%	70%	Extr.	70% Fr.	Extr.	70% Fr.
Se	1,4	1,8	3,7	2,8	2,3	1,4	2,3
se	2,1	1,7	0,1	0,8	0,1	0,0	0,3

Es läßt sich also feststellen: Die Differenzierung zwischen "H" an Se-BZ und "H" an se-BZ durch die Ulex-Fraktionen ist qualitativer, durch die Lotus- und Laburnum-Agglutinine jedoch lediglich quantitativer Natur.

Anmerkung: Der Ausfall der MZA hängt aber offensichtlich nicht allein von den gewählten Anti-H-Phytagglutininen und dem Sekretor-Typ der BZ ab, sondern es bestehen auch zwischen BZ von Spendern des gleichen Sekretor-Status z.T. erhebliche Unterschiede. (s. z.B. Nr.1 u. Nr.3 in Tab.2) Es ist nicht auszuschließen, daß neben dem Sekretor-Status auch ABO- und Le-Gruppenzugehörigkeit der BZ-Spender das Ergebnis der MZA beeinflusst. Auch unterschiedliche "H"-Beladung verschiedener BZ des gleichen Typs, wie solches bei Erythrozyten beobachtet werden konnte, mag von Bedeutung sein.

Abgesehen davon, daß ohnehin zur Klärung dieser Zusammenhänge größere Versuchsreihen nötig wären, lassen Stärkedifferenzen bei der MZA innerhalb der Se- bzw. der se-BZ-Gruppe bereits aus technischen Gründen, auf die kurz hingewiesen sei, keine weitreichenden Schlußfolgerungen zu. Die Mischzellagglutinate sind wenig stabil. Nach längerem Stehen oder bei Erschütterung neigen sie dazu, sich wieder aufzulösen. In der Kälte waren die Agglutinate beständiger. Deshalb wurden sie bis zum Mikroskopieren im Eiswasserbad gehalten. Nicht vermeidbar war eine gewisse Beeinträchtigung des Zusammenhaltes der Agglutinate durch ihre Übertragung auf den Objektträger und das Abdecken mit den Deckgläsern. Insofern konnte auch nach der unerläßlichen Einübung der Technik bei dieser Manipulation eine unterschiedslose Behandlung der Agglutinate nicht gewährleistet werden. Damit können Schwankungen im Ausfall der MZA erklärt werden, wodurch die quantitative Aussage etwas eingeschränkt wird.

Aus dem Briefwechsel mit Frau Lynn L. Flory, Cambridge habe ich dankbar jeden Hinweis auf mögliche Fehlerquellen bei der MZA-Technik aufgegriffen.

Für die Fragestellung nach Unterschieden im Verhalten von Se-BZ u. se-BZ bei der MZA wurden jedoch Antworten von hinreichender Genauigkeit erhalten.

In diesem Zusammenhang kann die Erwähnung einer durch die MZA aufgedeckten Fehleinordnung bezüglich des Sekretor-Status des Spenders Nr. 7 (Tab. 2-4) einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit der Methode geben: Der Spender war zunächst den Ausscheidern zugerechnet worden. Daran ließ erst der Ausfall der MZA mit seinen BZ Zweifel aufkommen. Die Wiederholung des Agglutinationshemmtests an Hand einer frischen Speichelprobe zeigte, daß es sich bei der fraglichen Person um einen Nichtausscheider handelte. Auf diese Weise kam die Inkongruenz in der Zusammensetzung der BZ-Spender der Gruppe O und der Gruppe A₁ zustande.

2. Vergleich der Hemmbarkeit der Anti-H-Reagenzien aus Ulex europaeus, Lotus tetragonolobus und Laburnum alpinum durch L-Fukose, Salicin und Laktose.

In Tabelle 6 sind sowohl die geometrischen Verdünnungen (1. Spalte), als auch die ihnen entsprechenden molaren Konzentrationen (2. Spalte) der Zuckerlösungen angegeben, welche die Erythrozytenagglutination der jeweiligen auch zur MZA benutzten Anti-H-Agglutinine hemmten. Es ist dabei zu beachten, daß die Ausgangslösung von L-Fukose 1%-ig, die von Salicin und Laktose jedoch aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von L.L. FLORY (2) 10%-ig hergestellt wurde.

Tabelle 7 gibt die Hemmungsbereiche der Zucker an, wobei jeweils die 1. (obere) Zahl den Konzentrationswert bezeichnet, bei dem gerade noch keine Agglutination eintrat (komplette Hemmung), die 2. (untere) Zahl den letzten Wert, der noch eine Abschwächung der Agglutination im Vergleich zur Kontrolle zeigte (Grenzwert der inkompletten Hemmung).

Die Ulex-Aethanolfraktionen ließen sich durch L-Fukose hemmen; und zwar am schlechtesten die 30%-ige (inkomplett bei 0,0609 mol.Konz.), am besten die 70%-ige (0,0076 mol.Konz.). Keine Fraktion unserer Ulex-Extrakte war aber durch Salicin oder durch Laktose hemmbar.

Lotus-Extrakt und seine 70%-ige Aethanolfraktion wurden sehr stark durch L-Fukose gehemmt (0,0010 bzw. 0,0019 mol.) aber auch in geringerem Maße durch Salicin (0,0873 bzw. 0,0437 mol.) und Laktose (0,0183 mol.)

Laburnum-Extrakt und seine 70%-ige Aethanolfraktion konnten nicht durch L-Fukose, wohl aber durch Salicin (0,0109 mol.) und Laktose (0,0365 bzw. 0,0183 mol.) gehemmt werden.

Die von L.L. FLORY (2) beobachtete Hemmung der 30%- und 50%-igen Ulex-Aethanolfraktion durch die glukosehaltigen Zucker

Tabelle 6

Hämagglutinationshemmung der Phyttagglutinine aus *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus* und *Laburnum alpinum* durch L-Fukose, Salicin und Laktose (Technik: s. Text S.15).

L-Fukose (1%)		Ulex-Aeth.-Frakt.			Lotus tetrag.		Laburn. alpin.	
Verdg. 1/- :	Mol. Konz.	30%	50%	70%	Extr.	70% Fr.	Extr.	70% Fr.
1	0,0609	1	0	0	0	0	3	3
2	0,0305	2	1	0	0	0	3	3
4	0,0152	3	2	0	0	0	3	3
8	0,0076	3	3	0	0	0	3	3
16	0,0038	3	3	1	0	0	3	3
32	0,0019	3	3	2	0	0	3	3
64	0,0010	3	3	3	0	1	3	3
128	0,0005	3	3	3	1	2	3	3
256	0,0002	3	3	3	2	3	3	3
512	0,0001	3	3	3	3	3	3	3

Salicin
(10%)

1	0,3493	-	-	-	-	-	-	-
2	0,1747	3	3	3	0	0	0	0
4	0,0873	3	3	3	0	0	0	0
8	0,0437	3	3	3	1	0	0	0
16	0,0218	3	3	3	2	1	0	0
32	0,0109	3	3	3	3	2	0	0
64	0,0055	3	3	3	3	3	1	1
128	0,0027	3	3	3	3	3	2	2
256	0,0014	3	3	3	3	3	3	3

Laktose
(10%)

1	0,2921	3	3	3	0	0	0	0
2	0,1461	3	3	3	0	0	0	0
4	0,0730	3	3	3	0	0	0	0
8	0,0365	3	3	3	0	0	0	0
16	0,0183	3	3	3	0	0	(1)	0
32	0,0091	3	3	3	1	(1)	2	1
64	0,0046	3	3	3	2	2	3	2
128	0,0023	3	3	3	3	3	3	3

Anmerkung: Zahlen = Agglutinationsstärke (s.Tab. 1), 0 = keine Agglutination infolge Neutralisation; - = nicht durchgeführt, weil die 10%-ige Lösung bei Zi.T. wieder auskristallisierte.

Tabelle 7

Übersicht über die Hemmaktivitäten der Zuckerlösungen für die Anti-H-Agglutinine aus den Versuchsprotokollen der Tabelle 6.

Phyttagglutininlösungen	Z u c k e r l ö s u n g e n					
	L-Fukose (1%)		Salicin (10%)		Laktose (10%)	
	Verdg. 1/- :	Mol. Konz.	Verdg. 1/- :	Mol. Konz.	Verdg. 1/- :	Mol. Konz.
Ulex europ.:						
30% Frakt.	(100)-*	(0,0609)-*				
	200	0,0305				
50% Frakt.	100-	0,0609-	keine		keine	
	400	0,0152	Hemmung		Hemmung	
70% Frakt.	800-	0,0076-				
	3200	0,0019				
Lotus tetr.:						
Extrakt	6400-	0,0010-	40-	0,0873-	160-	0,0183-
	25600	0,0002	160	0,0218	640	0,0046
70% Frakt.	3200-	0,0019-	80-	0,0437-	160-	0,0183-
	12800	0,0005	320	0,0109	640	0,0046
Laburn. alp.:						
Extrakt			320-	0,0109-	80-	0,0365-
	keine Hemmung		1280	0,0027	320	0,0091
70% Frakt.			320-	0,0109-	160-	0,0183-
			1280	0,0027	640	0,0046

Anmerkung: Die 1. (obere) Zahl bedeutet jeweils die Endverdünnung der kompletten Hemmung, die untere Zahl den Grenzwert der inkompletten Hemmung. Bei (*) keine komplette Hemmung.

(Salicin und Laktose) habe ich nicht bestätigen können. Immerhin zeigen aber auch hier wie schon bei der MZA die Ulex-Aethanolfraktionen ein differenzierteres Verhalten als die Anti-H-Reagenzien aus Lotus und Laburnum. Während sich die Extrakte aus Lotus und Laburnum von ihren 70%-igen Aethanolfraktionen bei der Hemmung nur unwesentlich unterschieden, differierten die 3 Ulex-Aethanolfraktionen in Bezug auf ihre Hemmbarkeit durch L-Fukose stark.

In Anbetracht dessen, daß die Agglutinine aus Lotus und Laburnum nach ihrer Affinität zu einfachen Kohlenhydraten als Exponenten entgegengesetzter Reaktionstypen gelten, müssen jedoch prinzipiell die Ulex-Aethanolfraktionen und hier besonders die 70%-ige nach den dargestellten Resultaten der Hemmungstests der Lotus- (Aalserum-) Gruppe zugeordnet werden. Die Einordnung der 30%- und 50%-igen Ulex-Fraktionen in die Laburnum- (Cytisus sessilifolius-) Gruppe (L.L. FLORY, 2) erscheint für unseren Ulex europaeus - Samen nicht gerechtfertigt.

Inzwischen hat L.L. FLORY (3) ihre Hemmungsversuche auch auf Lotus- und Laburnum-Extrakt ausgedehnt. Tabelle 8 bringt eine Synopse ihrer, meiner eigenen und der bereits früher von M. KRÜPE (8,9) veröffentlichten Ergebnisse.

3. Verhalten von Nabelschnurblutzellen gegenüber den verschiedenen Anti-H-Reagenzien (Tabelle 9).

50 Nabelschnurblutproben der Gruppe 0 wurden in Röhrchen gegen geometrische Verdünnungsreihen der Extrakte aus Ulex europaeus, Lotus tetragonolobus, Laburnum alpinum, Ononis spinosa, z.T. Evonymus europaea und z.T. gegen Verdünnungsreihen der 3 Ulex-Aethanolfraktionen getestet.

Die meisten Phytagglutinine reagierten mit Nabelschnur-Erythrozyten durchschnittlich um 1-2 Verdünnungsstufen schwächer, als mit O-Blut Erwachsener. Eine auffallende Ausnahme hiervon machten der Lotus-Extrakt und die 70%-ige Ulex-Aethanolfraktion:

Tabelle 8

Vergleich meiner Ergebnisse aus den Zuckerhemmungstests mit denen von L.L. FLORY (2,3) und M. KRÜPE (8,9).

		Flory(1966/67)		Eigene (1967)		Krüpe (1955/56)	
		Verdg. 1/- :	Mol. Konz.	Verdg. 1/- :	Mol. Konz.	Verdg. 1/- :	Mol. Konz.
L i F u k o s e	Ulex-Extr.	(12)	(0,5)			-	-
	Ul.-Fr.30%	-	-	(100)	(0,0609)	bei 50	bei 0,1218
	Ul.-Fr.50%	-	-	100	0,0609		
	Ul.-Fr.70%	800	0,0078	800	0,0076		
	Lot.-Extr.	400!	0,0156	6400!	0,0010	6400!	0,0010
	Lab.-Extr.	-	-	-	-	-	-
S a l i c i n	Ulex-Extr.	-	-			800	0,0044
	Ul.-Fr.30%	(35)	(0,1)	-	-		
	Ul.-Fr.50%	35	0,1	bei 20	bei 0,1747		
	Ul.-Fr.70%	-	-	bei 20	bei 0,1747		
	Lot.-Extr.	35	0,1	40	0,0873	-	-
	Lab.-Extr.	138	0,025	320	0,0109	bei 50 800	bei 0,077 0,0044
L a k t o s e	Ulex-Extr.	(12)	(0,25)			-	-
	Ul.-Fr.30%	6	0,5	-	-	bei 50	bei 0,0584
	Ul.-Fr.50%	12	0,25	bei 10	bei 0,2921		
	Ul.-Fr.70%	-	-	bei 10	bei 0,2921		
	Lot.-Extr.	93	0,0323	160	0,0183	100	0,0292
	Lab.-Extr.	23!	0,125	80!	0,0365	100!	0,0292

Anmerkung: In Klammer gesetzte Zahlen bedeuten inkomplette Hemmung. Ausbleiben einer Hemmung ist durch "-" gekennzeichnet. Wo grundsätzliche Gegensätze bezüglich der Hemmung bzw. Nichthemmung bestehen, ist unter dem jeweils negativen Ergebnis die Konzentration angegeben, bei der es erhalten wurde.

Tabelle 9

Titer der verschiedenen Anti-H-Phytagglutininpräparate gegen-
über O-Erythrozyten aus Nabelschnurblutproben.

O-Blut Lf.Nr.	R o h e x t r a k t e					Ulex-Aeth.-Fraktionen		
	Ulex europ.	Lotus tetr.	Lab. alp.	Onon. spin.	Evon. europ.	30%	50%	70%
1	32	(4)	8	16				
2	16	(2)	(16)	16	nicht			
3	32	4	8	16			nicht	
4	16	0	4	16	durchge-			
5	32	(8)	8	32	führt		durchge-	
6	16	0	8	16				
7	8	0	8	(16)				
8	16	0	16	16	32		führt	
9	32	(2)	16	32	32			
10	32	4	8	16	32			
11	16	0	8	16	32			
12	16	0	8	8	32			
13	32	0	8	16	16			
14	(64)	2	16	32	32	16	32	8
15	32	0	16	16	32	16	32	8
16	32	0	16	16	64	32	32	8
17	32	0	16	16	64	32	32	16
18	32	0	16	16	32	32	32	8
19	32	0	4	16	(64)	16	32	8
20	16	0	4	16	16	16	16	4
21	32	2	8	16	32	16	16	8
22	16	4	4	32	64	32	32	8
23	16	0	8	16	16	8	16	(4)
24	16	0	8	16	64	16	32	8
25	16	0	8	8	32	16	32	8
26	16	0	8	16	32	16	16	8
27	8	0	2	8	16	8	8	2
28	16	2	8	16	16	16	16	8
29	16	0	8	16	32	16	32	8
30	(16)	0	(4)	16	8	8	8	4
31	(32)	0	8	16	32	16	32	8
32	16	0	4	16	16	16	32	4
33	16	0	8	16	32	16	16	4
34	64	(4)	16	32	64	32	32	16
35	16	2	16	8	16	8	16	8
36	64	4	8	16	32	16	16	8
37	16	0	4	16	8	8	8	2
38	32	2	8	16	32	16	32	16
39	16	0	4	8	(16)	(16)	16	2
40	16	0	8	16	16	16	16	2
41	32	0	16	16	32	16	32	(8)
42	32	0	16	16	32	16	16	2
43	32	0	16	16	32	16	32	4
44	16	0	8	16	16	16	16	2
45	(32)	0	16	(32)	32	16	32	4
46	16	0	8	16	(32)	16	16	(4)
47	32	0	4	16	16	16	32	16
48	32	0	8	16	32	16	(32)	(8)
49	32	2	8	16	16	16	32	8
50	16	0	4	16	8	16	16	4
Kontr: O- Erys. (Er- wachs.)	64	64	(16)	32	64	64	128	256

Anmerkung: Die Zahlen geben den jeweils im Röhrchentest er-
mittelten Endtiter an. () bedeutet, daß der End-
titer (1) war (s.Tab.1).

Lotus-Extrakt agglutinierte in der Verdünnung von 1:2 die meisten Nabelschnur-Erythrozyten nicht, die 70%-ige Ulex-Aethanolfraktion um durchschnittlich 5-6 Verdünnungsstufen schwächer als O-Erythrozyten Erwachsener. Nur bei 10% der Nabelschnurblute wurde mit der 70%-igen Ulex-Aethanolfraktion ein Agglutinationstiter von 1:16 erreicht (Nr.17,34,38,47). Aber auch die 50%-ige Ulex-Aethanolfraktion zeigte bei ihrer Testung gegenüber Nabelschnur-Erythrozyten eine über dem Durchschnitt der übrigen Anti-H-Reagenzien liegende Titerreduktion (2-3 Stufen).

Beim Vergleich dieser Beobachtungen mit den Ergebnissen der Agglutinationshemmungsreaktionen mit Zuckern (s.Tab.6-8) läßt sich folgende Beziehung herstellen: Je besser ein Anti-H-Phyttagglutinin durch L-Fukose hemmbar ist, desto schlechter agglutiniert es Nabelschnur-Erythrozyten.

Allerdings bestand bezüglich der Titerwerte nicht in allen Fällen eine Parallelität zwischen dem Lotus-Extrakt und der 70%-igen Ulex-Aethanolfraktion.

4. Transformationsversuche mit Nabelschnurblut-Erythrozyten (Anlagerung von ABH-(Le-)Mukoiden).

Das der Inkubation von Nabelschnur-Erythrozyten dienende Erwachsenen-Plasma stammte von Personen der Blutgruppen O, Le(a- b+) und A₁B, Le(a- b+).

Das Blut des O-Spenders wurde durch Anti-H-Phyttagglutinine sehr stark agglutiniert (Ulex-Extrakt 1:256, Lotus-Extrakt 1:256). Im Plasma der A₁B-Person konnte, wie Tabelle 10 zeigt, gelöste A-Substanz durch Agglutinationshemmung nachgewiesen werden. Man erkennt, daß die Anwesenheit des Plasmas einen Titerrückgang des Anti-A-Serums bewirkt hat, eine Folge neutralisierender A-Substanz im Plasma.

Die für die Transformationsversuche benutzten Nabelschnur-Erythrozyten stammten aus den Proben Nr. 23 und Nr. 32 (Tab.9). Sie waren Le(a- b-).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Versuche einer in-vitro-Transformation der ABO-Eigenschaften an Erythrozyten Erwachsener (J.H. LEWIS, J. DRAUDE u. W.J. KUHNS 1960, (12); P.H. RENTON u. J.A. HANCOCK 1962, (18); M. KODANI 1962, (6); O. MÄKELÄ, P. MÄKELÄ u. A. KORTEKANGAS 1967, (15)) habe ich auch bei Verwendung von Nabelschnur-Erythrozyten keine Adsorption von A- bzw. B-Substanz, noch eine Verstärkung bzw. Modifikation ihrer Agglutinabilität durch H-spezifische Phytagglutinine beobachtet.

Die Le(b)-Eigenschaft dagegen wurde bereits innerhalb der ersten 24 Std. sowohl aus dem O-Plasma als auch aus dem A₁B-Plasma auf die darin inkubierten Nabelschnur-Erythrozyten übertragen. Das Maximum ihrer Le(b)-Agglutinabilität war nach 48-std. Inkubation erreicht und schwächte sich erst mit dem Einsetzen der Hämolyse am 5. Tag ab. Die Agglutination der in dem Plasma des O-Spenders inkubierten Erythrozyten durch Anti-Le(b)-Serum war stärker ausgeprägt, als die der im Plasma des A₁B-Spenders inkubierten. Dies entsprach der Le(b)-Charakteristik der zu den Plasmen gehörigen Spender-Erythrozyten.

Zusatz von H-Substanz in Form von Speichel eines starken "H-Ausscheiders" zum O-Plasma und von käuflicher A-Substanz zum A₁B-Plasma konnte ebenfalls nicht die erhoffte ABH-Transformierbarkeit der Nabelschnurblutzellen beweisen.

Tabelle 10

Nachweis von A-Substanz im Plasma eines Spenders der Blutgruppe A₁B, Le(a- b+) durch Agglutinationshemmung (Technik s. Text S.15).

	Je 1 Tr. verd. Anti-A-Serum						
	Verdg.: 1/- :						
	2	4	8	16	32	64	128
+ je 1 Tr. A ₁ B-Plasma	3	2	1	0	0	0	0
+ Je 1 Tr. 0,9% NaCl	3	3	3	2	2	1	0

Zugabe von je 1 Tr. einer 2%-ig. Susp. von A₁-Erys. nach 1 Std. Bindungszeit. Ablesung der Agglutination 15 min später nach kurzer Zentrifugation (1 min bei 1500 U/min).

Besprechung

Aus meinen Untersuchungen über Unterschiede im H-Antigen an Buccalzellen und O-Erythrozyten im Nabelschnurblut lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die als Detektoren für unterschiedliche H-Determinanten an Zellen benutzten Pflanzenextrakte aus Samen von *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus* und *Laburnum alpinum* ließen in Agglutinationshemmungstests (O-Blutzellen) mit Zuckern (L-Fukose, Salicin, Laktose) in Übereinstimmung mit der Literatur (1,2,3,8,9,11,14,19) Anti-H-Agglutinine unterschiedlicher Spezifität erkennen:
 - a) Die Aethanolfraktionen aus *Ulex europaeus* erwiesen sich als L-Fukose-spezifisch bei ausgeprägten quantitativen Unterschieden; d.h., die 30%-ige reagierte kaum, die 50%-ige gering, die 70%-ige jedoch gut mit L-Fukose. Die Glukose enthaltenden Zucker (Salicin, Laktose) zeigten im Gegensatz zu den Angaben von L.L. FLORY (2) bei keiner Fraktion eine neutralisierende Wirkung.
 - b) Dagegen ließ sich die ausgeprägte L-Fukose-Spezifität des Anti-H-Agglutinins aus *Lotus tetragonolobus* durch Aethanolfraktionierung nicht abstufen. Lotus-Extrakt und seine 70%-ige Aethanolfraktion waren in gleichem Maße durch L-Fukose und schwächer auch durch Salicin und Laktose hemmbar.
 - c) Ebenso bedeutungslos erwies sich die Aethanolfraktionierung bei dem allein durch Salicin und Laktose hemmbaren Anti-H-Agglutinin aus *Laburnum alpinum*.
2. H-Determinanten an Buccalzellen (BZ) von Ausscheidern (Se) und Nichtausscheidern (se).

Wie die Versuche mit der Mischzellagglutination ergeben haben, reagieren Se-BZ mit allen Anti-H-Reagenzien.

Dagegen reagieren se-BZ nicht mit der 70%-igen, gut jedoch mit der 30%- und 50%-igen Aethanolfraktion aus *Ulex europaeus*. (Die 30%-ige sprach sogar besser auf se-BZ als auf Se-BZ an.)

Sie reagieren ebenfalls -wenn auch nur schwach- mit den Anti-H-Reagenzien aus Lotus und Laburnum, allerdings nur mit stärker angereicherten Agglutininlösungen, nicht mit solchen von niedrigem Titer.

Die durch diese letzteren Agglutinine mögliche Unterscheidung zwischen Se-BZ und se-BZ wurde daher eine "quantitative" genannt. Dagegen differenzieren die Ulex-Fractionen unabhängig von ihrem Agglutinationstiter gegenüber O-Blutzellen "qualitativ" zwischen Se-BZ und se-BZ.

Diese Befunde lassen bezüglich der Verteilung der H-spezifischen Determinanten an BZ von Ausscheidern und Nichtausscheidern folgende Interpretation zu:

An BZ kommen 3 verschiedene H-Strukturen vor:

- a) Eine ist allen BZ gemeinsam. Sie wird von der 30%-(u.50%)-igen Ulex-Aethanolfraction erfaßt. Ihre Antigen-Konfiguration kann weder durch L-Fukose, noch durch glykosidische Kohlenhydratstrukturen vom Salicin-bzw. Laktosetyp wesentlich bestimmt sein.
- b) Eine andere tritt nur an Se-BZ auf, wird durch L-Fukose determiniert und läßt sich daher durch L-Fukose-spezifische Agglutinine (70%-ige Ulex-Fraktion, Lotus-Agglutinin) nachweisen.
- c) Eine dritte H-Determinante erscheint ebenfalls an Se-BZ, in geringerem Maße aber auch an se-BZ. Sie ist wahrscheinlich durch einen größeren Molekülbezirk der Oligosaccharidkette charakterisiert und reagiert sowohl mit dem Laburnum-Agglutinin als auch mit der ebenfalls durch Salicin und Laktose hemmbaren Komponente des Lotus-Agglutinins (nach M. KRÜPE und A. ENSGRABER (11)).

Das Vorhandensein dieser 3. H-Determinanten auch an se-BZ kann die, wenn auch geringe, so doch deutliche Ansprechbarkeit der stärkeren Agglutinine aus Lotus und Laburnum auf se-BZ erklären, während die allein L-Fukose-spezifische 70%-ige Ulex-Aethanolfraction (trotz ihrer starken Wirksamkeit auf O-Erythrozyten) nicht mit ihr zu reagieren vermag.

Auf diese Weise läßt sich die "qualitative" Unterscheidung zwischen Se-BZ und se-BZ durch die Ulex-Aethanolfraktionen und die lediglich "quantitative" Unterscheidung durch die Agglutinine aus Lotus und Laburnum einem Verständnis zuführen.

3. H-Determinanten an Erythrozyten der Gruppe O in Nabelschnurblutproben. (Transformationsversuche)

Nabelschnur-O-Erythrozyten werden durch L-Fukose-spezifische Agglutinine (70%-ige Ulex-Fraktion, Lotus-Agglutinin) sehr viel schlechter bzw. gar nicht agglutiniert im Vergleich zu O-Blutzellen von Erwachsenen. Bei diesen Reagenzien besteht eine direkte Proportionalität zwischen ihrer reduzierten Wirksamkeit gegenüber Nabelschnur-Erythrozyten und ihrer Hemmbarkeit durch L-Fukose.

Lotus-Extrakt und die 70%-ige Ulex-Aethanolfraktion verhielten sich jedoch nicht in allen Fällen gleichsinnig. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß diese beiden durch L-Fukose zwar gemeinsam gut hemmbaren Agglutinine doch bezüglich ihrer Reaktionsfähigkeit mit H-Antigenstrukturen zumindest nicht als identisch angesehen werden dürfen.

"L-Fukose-H" scheint an kindlichen Blutzellen nur in geringem Maße vorhanden zu sein. In den Fällen, wo es etwas vermehrt nachgewiesen werden konnte, fanden sich in den dazugehörigen Seren mütterliche Antikörper. Der Gedanke liegt nahe, daß hier auch aus dem mütterlichen Plasma stammende L-Fukose-determinierte Mukoide möglicherweise sich an die kindlichen Blutzellen angelagert haben im Sinne einer in vivo-Transformation.

In vitro konnte eine Transformation von Nabelschnur-O-Erythrozyten mit H-, A- od. B-Mukoiden durch Inkubation im Plasma Erwachsener nicht erzielt werden, obwohl im gleichen Versuch ohne Schwierigkeiten eine Anlagerung des Le(b)-Mukoids gelang und in anderen Versuchen eine Anlagerung von Le(a).

Es bleibt ungeklärt, warum die chemisch so ähnlichen ABHLe-Mukoiden sich bezüglich ihrer Adsorptionsfähigkeit an Erythrozyten so unterschiedlich verhalten. Insbesondere ist es schwer verständlich, daß die L-Fukose-determinierten Le(a) und Le(b)-Mukoiden sich leicht an die Erythrozytenoberfläche anlagern, das ebenfalls L-Fukose-determinierte H-Mukoid dagegen nicht, wenigstens nicht in vitro. Vielleicht ist für die Anheftung von Mukoiden an Erythrozyten im Gegensatz zu anderen Körperzellen eine durch Le(a) bedingte sterische Konfiguration erforderlich, die auch im Le(b)- aber nicht im H-Mukoid vorhanden ist. (s.S.6 u.Abb.1)

Als weitere Ursachen für die negativen Ergebnisse kommen fernerhin in Betracht:

- a) Eine 5-tägige Inkubation reicht für eine Transformation von Erythrozyten mit ABH-Mukoiden nicht aus.
- b) Eine stattgehabte Transformation ist so geringgradig, daß sie nicht nachgewiesen werden kann.
- c) Die adsorbierten Antigene haften nicht fest genug und werden von den Agglutininen von der Zelloberfläche abgerissen, so daß eine Agglutination ausbleibt.

4. Mukoid- bzw. Glykolipoid-Natur der H-Substanzen.

Zu der abschließenden Frage, welche der 3 hypothetischen H-Determinanten den Mukoiden, welche den Glykolipoiden angehören, geben die Ergebnisse der angestellten Untersuchungen keine eindeutige Antwort, aber vielleicht einige Hinweise:

In Übereinstimmung mit der Tatsache, daß L-Fukose bei der biochemischen Analyse lipoider Blutgruppensubstanzen nicht oder nur sehr wenig gefunden wurde (J.KOSCIELAK 1965, (7)), sprechen auch unsere Resultate für die allein bei den Mukoiden vorkommende "L-Fukose-H-Determinante"; denn sie konnte nicht an se-BZ nachgewiesen werden, und auch an Nabelschnur-Erythrozyten war sie nur sehr schwach ausgeprägt. Sie scheint ebenso wie die L-Fukose-determinierten Le-Eigenschaften aus

dem umspülenden Medium erst sekundär an die Zellen angelagert zu werden, bildet also wahrscheinlich keinen integrierenden Bestandteil der Zellmembran.

Die im wesentlichen durch Laburnum-Agglutinin erfaßbare "glykosidische H-Determinante" scheint an BZ vorwiegend mukoider, aber in geringerem Maße auch glykolipoider (zellständiger) Natur zu sein; denn Se-BZ reagieren erheblich stärker mit Laburnum-Agglutinin als se-BZ.

An Nabelschnur-Erythrozyten überwiegt offensichtlich die glykolipoide Erscheinungsform, da diese durch Laburnum relativ gut agglutiniert werden.

Jene Komponente jedoch, die besonders gut von der 30%-igen Ulex-Aethanolfraktion erfaßt wird, ist an BZ anscheinend nur als zellständiges Glykolipoid vorhanden und wird hier vielleicht von mukoiden H-Determinanten überdeckt; andernfalls wäre es nicht verständlich, weshalb die 30%-ige Ulex-Aethanolfraktion mit se-BZ besser reagiert als mit Se-BZ. Die Erwartung, daß sie dementsprechend auch an Nabelschnur-Erythrozyten stärker hervortreten müsse als an denen Erwachsener, hat sich allerdings in unseren Versuchen nicht erfüllt.

Zusammenfassung

Angeregt durch eine im Jahre 1966 erschienene Arbeit von L.L. FLORY (2) über Antigenunterschiede in der H-Blutgruppensubstanz an Wangenschleimhautzellen (=Buccalzellen) wurden serologische Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, das Problem der heterogenen Ausstattung der Zelloberfläche (Erythrozyten und Epithelzellen) mit ABHLe-Antigenen zu erhellen.

Buccalzellen (BZ) von Sekretoren (Se) und Nichtsekretoren (se) folgender Typen:

- Le(a- b+), Se
- Le(a+ b-), se
- Le(a- b-), Se
- Le(a- b-), se,

ferner O-Erythrozyten von Neugeborenen im Vergleich zu solchen Erwachsener wurden auf unterschiedliche H-Determinanten mit pflanzlichen Anti-H-Reagenzien untersucht.

Die BZ wurden auf Mischzellagglutination mit O-Erythrozyten getestet. Dabei kamen im einzelnen die nachstehend aufgeführten Anti-H-Reagenzien zur Anwendung, deren Kohlenhydrat-Spezifität mit Hilfe der Hämagglutinationshemmung von O-Erythrozyten durch L-Fukose, Salicin und Laktose zu ihrer Charakterisierung überprüft wurde.

- a) Phyttagglutininlösungen aus Präzipitaten aus Ulex europaeus-Extrakt, die bei seiner 30%-, 50%- und 70%-igen Alkohol-Sättigung erhalten wurden (=Aethanolfraktionen).
 - b) Rohextrakt aus Lotus tetragonolobus und die daraus gewonnene 70%-ige Aethanolfraktion.
 - c) Laburnum alpinum-Extrakt und seine 70%-ige Aethanolfraktion.
1. Ergebnisse aus den Versuchen mit der Mischzellagglutination (BZ - Erys.) und den Hemmungstests mit Zuckern:

Se-BZ reagierten mit allem Anti-H-Reagenzien, am besten jedoch mit der allein durch L-Fukose hemmbaren 70%-igen Aethanolfraktion aus Ulex europaeus.

se-BZ reagierten nicht mit der 70%-igen Ulex-Fraktion, gut jedoch mit der 30%- (50%-) Ulex-Fraktion, die nur schwach durch L-Fukose, ebenfalls nicht durch Salicin und Laktose hemmbar war. (Diese Befunde bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse von L.L. FLORY (2) mit der Ausnahme, daß die von ihr konstatierte Inhibition der 30%- und 50%-igen Ulex-Fraktion durch Salicin und Laktose von uns nicht reproduziert werden konnte.)

se-BZ reagierten ferner z.T. noch mit dem Agglutinin aus *Laburnum alpinum*, welches allein durch Salicin und Laktose, und auch etwa gleich stark mit dem Lotus-Agglutinin, welches extrem gut durch L-Fukose, aber auch durch Salicin und Laktose gehemmt wurde.

2. Der Hamagglutinationstiter von Extrakten aus *Ulex europaeus*, *Lotus tetragonolobus*, *Laburnum alpinum*, *Ononis spinosa*, *Evonymus europaea* und von den Ulex-Aethanolfraktionen (30%, 50%, 70%) gegenüber O-Erythrozyten aus 50 Nabelschnurblutproben wurde ermittelt. Aus dem Vergleich dieser Titerwerte mit denen, die gegenüber O-Blutzellen Erwachsener erhalten wurden, ergab sich:

Die L-Fukose-spezifischen Agglutinine (Lotus-Extrakt, 50%- und 70%-ige Ulex-Fraktion) agglutinierten kindliche Erythrozyten nur noch schwach oder gar nicht mehr. Demgegenüber erfuhren die übrigen Anti-H-Reagenzien bei Verwendung von Nabelschnur-Erythrozyten nur eine mäßige Reduktion ihres Agglutinationstiters.

Es wurde beobachtet, daß die Seren derjenigen kindlichen Erythrozyten, die mit den L-Fukose-spezifischen Agglutininen (bes. der 70%-ig. Ulex-Frakt.) besser als der Durchschnitt reagierten, mütterliche Antikörper (Anti-A u./od. Anti-B) enthielten. Dies wurde als Hinweis auf eine mögliche in-vivo-Transformation bezüglich des H-Antigens an Nabelschnurblutzellen durch zusätzliche Mukoide aus dem mütterlichen Kreislauf angesehen.

In vitro gelang es dagegen nicht, Nabelschnur-Erythrozyten durch Inkubation im Plasma Erwachsener in Bezug auf ihre ABH-Eigenschaften zu transformieren, obgleich im selben Versuch eine

Anlagerung des Le(b)-Mukoids aus dem Plasma stattfand.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wird die Hypothese abgeleitet, daß an menschlichen BZ 3 verschiedene H-spezifische Strukturen vorkommen; eine davon tritt nur an BZ von Se-Personen in Erscheinung. Diese ist durch L-Fukose determiniert und wird daher von der 70%-igen Ulex-Aethanolfraktion spezifisch erfaßt.

Unter Einbeziehung der Hämagglutinationsresultate an Nabelschnur-Erythrozyten wird diskutiert, welche dieser 3 H-Komponenten den Mukoiden und welche den Glykolipoiden zugeordnet werden könnte.

Ferner werden mögliche Gründe für die negativen Ergebnisse der Transformationsversuche an Erythrozyten angeführt.

Literaturverzeichnis

1. Bird, G.W.G.: Haemagglutinins in Seeds. Brit.med.Bull. Vol. 15 No.2, 165-168 (1959)
2. Flory, L.L.: Differences in the H Antigen on Human Buccal Cells from Secretor and Non-Secretor Individuals. Vox Sang. 11, 137-156 (1966)
3. Flory, L.L.: Comparison of Lectin Anti-H Reagents. Vox Sang. 13, 357-361 (1967)
4. Flory, L.L.: A and H Antigens on Leucocytes. Vox Sang. 13, 362-365 (1967)
5. Glynn, M.D., E.J. Holborow: Distribution of Blood-Group Substances in Human Tissues. Brit.med.Bull.Vol.15 No.2, 150-153 (1959)
6. Kodani, M.: In vitro Alteration of Blood Group Phenotypes of Human Epithelial Cells Exposed to Heterologous Blood Group Substances. Proc.Soc.Exp.Biol. and Med. 109, 252-258 (1962)
7. Koscielak, J.: ABO Blood Group Substances from Erythrocytes as "Lipid" Antigens. Proc. 10th Congr. int. Soc. Blood Transf., Stockholm 1964; 453-464 (1965)
8. Krüpe, M.: Über die Reaktionsfähigkeit pflanzlicher Hämagglutinine mit wasserlöslichen Blutgruppenmucoiden und einfacher gebauten Kohlenhydratmolekülen. Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 299, 277-282 (1955)
9. Krüpe, M.: Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper (Phyttagglutinine). Stuttgart: Enke 1956
10. Krüpe, M.: Zur Biochemie der ABOLe- und MNSs-aktiven Blutgruppensubstanzen. Arbeitsgemeinschaft Deutscher Blutgruppensachverständiger. Bericht über die 4. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Gerichtlicher Blutgruppensachverständiger am 18. und 19.4.1966 in Bad Homburg v.d.H. Gugel, Würzburg; S. 28-33

11. Krüpe, M., A. Ensgraber: Phythämagglutinine. Ber. 12.Tag. dtsch. Ges. Bluttransf., Basel 1966. Bibl.haemat., vol. 27, 34-49, Karger, Basel/New York (1967)
12. Lewis, J.H., J. Draude and W.J. Kuhns: Coating of "O" Platelets with A and B Group Substances. Vox Sang. 5, 434-441 (1960)
13. Mäkelä, I. and P. Mäkelä: Le^b Antigen. Studies on Its Occurence in Red Cells, Plasma and Saliva. Ann.Med.exp.Fenn. 34, 157-162 (1956)
14. Mäkelä, O.: Studies in Haemagglutinins of Leguminosae Seeds, Thesis. Ann.Med.exp.Fenn. 35 Suppl. 11, 1-133 (1957)
15. Makelä, O., P. Mäkelä and A. Kortekangas: In vitro Transformation of the Lewis Blood Groups of Erythrocytes. Ann.Med.exp.Fenn. 45, 159-164 (1967)
16. Morgan, W.T.J. and W.M. Watkins: Some Aspects of the Biochemistry of the Human Blood-Group Substances. Brit.med. Bull. vol. 15, No.2, 109-112 (1959)
17. Rege, V.P., T.J. Painter, W.M. Watkins and W.T.J. Morgan: Isolation of Serologically Active Fukose-Containing Oligosaccharides from Human Blood-Group H Substance. Nature, vol. 203, No. 4943, 360-363 (1964)
18. Renton, P.H. and J.A. Hancock: Uptake of A and B Antigens by Transfused Group O Erythrocytes. Vox Sang. 7, 33-38 (1962)
19. Saber, M.S., R. Drzeniek und M. Krüpe: Freilegung von ABH-Blutgruppen determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten durch Neuraminidase-Einwirkung. Z. Naturforschg. 20 b, 965-973 (1965)
20. Sneath, J.S. and P.H.A. Sneath: Adsorption of Blood-Group Substances from Serum on Red Cells. Brit.med.Bull. vol.15, No.2, 154-157 (1959)
21. Swinburne, L.M., B.B. Frank and R.R.A. Coombs: The A Antigen on Buccal Epithelial Cells of Man. Vox Sang. 6, 274-286 (1961)

22. Szulman, A.E.: The Histological Distribution of the Blood Group Substances in Man as Disclosed by Immunofluorescence.
II. The H Antigen and Its Relation to A and B Antigens. J. exp.Med. 115, 977-995 (1962)
III. The A, B and H Antigens in Embryos and Fetuses from 18 mm in Length. J.exp.Med. 119, 503-516 (1964)
23. Watkins, W.M.: Blood Group Substances. Science 152, 172-181 (1966)
24. Watkins, W.M.: Relationship between Structure, Specificity Genes within the ABO and Lewis Blood-Group System. Proc. 10th Congr. int. Soc. Blood Transf., Stockholm 1964, 443-452 (1965)
25. Watkins, W.M. and W.T.J. Morgan: Further Observations on the Inhibition of Blood-Group Specific Serological Reactions by Simple Sugars of Known Structure. Vox Sang. 7, 129 (1962)

Lebenslauf

Am 11. Juni 1936 wurde ich als Sohn des Arztes, Dr. med. Gerhard Linnemann, und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Suntheim, in Erfurt/Thüringen geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Hilders/Rhön, wo mein Vater sich 1938 als prakt. Arzt niedergelassen hatte. In Hilders besuchte ich die Volksschule, in der nahen Kreisstadt Fulda ab Herbst 1947 des Staatl. Domgymnasium. Mein Abitur bestand ich im Frühjahr 1957. Im Sommer-Semester desselben Jahres fing ich an der Universität in Göttingen an, Medizin zu studieren. Ein Jahr blieb ich in Göttingen, dann setzte ich mein Studium an der Universität in Würzburg fort. Am 27.2.1960 legte ich dort die Ärztliche Vorprüfung ab.

Das Studium der klinischen Fächer habe ich anschließend an der Freien Universität in Berlin betrieben. Auch meine Medizinalassistentz habe ich nach dem am 8.10.1963 bestandenen Staatsexamen in Berlin abgeleistet, und zwar:
vom 1.1.1964 - 31.7.1964 an der Inneren Abteilung des Königs-warter Krankenhauses in Lichterfelde,
vom 1.9.1964 - 31.12.1964 an der Chirurgischen Abteilung des Bethanienkrankenhauses in Kreuzberg,
vom 1.1.1965 - 30.11.1965 am Institut für Sozialhygiene der Freien Universität unter Herrn Professor von Manger-Koenig und
vom 1.12.1965 - 31.3.1966 an der Geburtshilflichen und Gynäkologischen Abteilung des Wenckebach-Krankenhauses in Tempelhof.

Nach sechsjährigem Aufenthalt in Berlin ging ich nach meiner Bestallung zum Arzt am 31.3.1966 nach Hilders zurück. Hier war ich dann vom 1.4.1966 bis zum 31.9.1966 als Assistent in der väterlichen Landpraxis tätig. Im November des gleichen Jahres wandte ich mich mit der Bitte um ein Dissertationsthema an Herrn Professor Krüpe, den Direktor des Staatl. Medizinaluntersuchungsamtes in Fulda. Herr Professor Krüpe stellte mir das Thema "Serologische Untersuchungen über Unterschiede des H-Blutgruppenantigens an epithelialen (Mundschleimhaut-) Zellen

von Sekretoren und Nichtsekretoren sowie auch an O-Erythrozyten von Neugeborenen und Erwachsenen" und führte mich in Problemstellung und in die serologischen Untersuchungsverfahren ein. Durch seine Vermittlung habe ich einen Teil meiner experimentellen Arbeit am Humangenetischen Institut der Universität Marburg unter Herrn Professor Wendt durchführen können.

Am 23.3.1967 habe ich mich mit der Ärztin Dr.med. Brigitte Schmalfuß in Marburg verheiratet. Meine Frau ist seit dem 1.5. 1967 als wissenschaftliche Assistentin an der hiesigen Universitäts-Nervenklinik tätig. Wir haben am 1.4.1967 unseren festen Wohnsitz in Marburg genommen.

Meine Dissertationsarbeit habe ich je nach ihren technischen Erfordernissen teils am Humangenetischen Institut in Marburg, teils am Staatlichen Medizinaluntersuchungsamt in Fulda fortgesetzt und am 10.2.1968 abgeschlossen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

in Göttingen:

Bachmann, Blechschmidt, Brockmann, Glemser,
Heyse, Hilsch, Metzner, Piepho.

in Würzburg:

Fischer, Hufschmidt, Kulenkampff, Müller,
Neubert, Roedig, Schroer, Thorn, Turba.

in Berlin:

Anschütz, Bartelheimer, Boschann, Bruntsch,
Bücherl, Frommhold, Gansau, Gasteiger,
Gerharts, Goerke, Grunze, Handl, Harndt,
Herken, v. Herrath, Höring, Kleberger,
Krauland, v. Kreß, Linder, Loeschke,
v. Manger-Koenig, Maßhoff, v. Mikulicz-
Radecki, Nau, Oeser, Pannhorst, Pellnitz,
Penzholz, Pezold, Remmer, Ritter, Rommeney,
Schettler, Schliak, B. Schmidt, Schröder,
Schütz, Selbach, Siebert, Spier, Stein,
Thies, Vogelsang, Witt, Ziolkow.

in Marburg:

Cleve, Krüpe, Wendt.

Bei Herrn Prof. Dr.med. M. Krüpe möchte ich mich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die hilfreichen Unterweisungen in Theorie und Praxis der Blutgruppenserologie und die kontinuierliche Förderung der Arbeit sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr.med. G.G. Wendt schulde ich Dank dafür, daß er mir einen Arbeitsplatz im Humangenetischen Institut der Universität Marburg zur Verfügung stellte und mir in großzügiger Weise die Benutzung der Laboreinrichtung gestattete.

